

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIVERSIDAD MOTOLINÍA
FACULTAD DE QUIMICA

*Estudios Cinéticos de la
Metahemoglobina Reductasa en
Eritrocitos de Rata*

TESIS

Que para obtener el Título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
presenta:
ROSA MARIA RUIZ SALINAS

MEXICO D. F.
1962



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mis queridos padres,
ERNESTO RUIZ ZAPATA
AMANDA SALINAS DE RUIZ ZAPATA
con cariño y gratitud.

A mis hermanos,
FRANCISCO ERNESTO
VIOLETA
MARIO BENITO

Al Dr. JESUS TORRES GALLARDO

Quien con su acertada dirección
hizo posible la realización de este
trabajo.

**Al Dr. GUILLERMO SOBERON y al Departamento de Bioquímica
del Instituto Nacional de la Nutrición por la colaboración
y ayuda que me brindaron.**

**ESTUDIOS CINETICOS DE LA METAHEMOGLOBINA
REDUCTASA EN ERITROCITOS DE RATA**

- 1) INTRODUCCION.
- 2) MATERIAL Y METODOS.
- 3) RESULTADOS.
- 4) DISCUSION.
- 5) RESUMEN Y CONCLUSIONES.
- 6) BIBLIOGRAFIA.

INTRODUCCION

El eritrocito es un elemento cuya importancia fisiológica es fundamental (1); su principal función es transportar el oxígeno de los pulmones a los diferentes territorios orgánicos donde permite la obtención de niveles adecuadas de energía a partir de los alimentos; como resultado de los procesos metabólicos se produce CO_2 , que parcialmente se combina con hemoglobina para ser llevado hacia campos pulmonares y ser eliminado.

La función de transporte de gases por el eritrocito (Fig. 1) depende de la presencia de la hemoglobina, proteína conjugada que constituye aproximadamente el 34% del peso total de glóbulo rojo; la actividad de algunas de las enzimas del eritrocito se orientan hacia la conservación de las propiedades de la hemoglobina; (2,3) ellas producen Trifosfopiridinao que cótico reducido y difosfopirinao nucleotido reducido, (Fig. 2) coenzimas que proporcionan los electrones necesarios para la reducción del ión férrico de la metahemoglobina a ión ferroso de la hemoglobina (Fig. 3). (4, 5) la transformación inversa la de hemoglobina a metahemoglobina ocurre de manera continua, (6) aunque en proporción mínima, de modo que en el individuo normal el 1 a 2% de la hemoglobina total se transforma a metahemoglobina en veinte y cuatro horas. Este proceso depende la actividad de glucosa - 6 - fosfato deshidrogenasa y 6 - fosfogluconico-- deshidrogenasa en relación a TPNH y (7,8) la catálisis por deshidrogenasa láctica y gliceraldehído - 3 - fosfato deshidrogenasa con respecto a DPNH. (9, 10) (Fig. 1)

Las coenzimas mencionadas se utilizan a dos niveles diferentes (Fig. 3).

1o. son utilizadas en la actividad de metahemoglobina reductasa (11) y

2o. permiten la actividad catalítica de glutatión reductasa (12) y determinan de ese modo los niveles de glutatión reducido; de este modo se mantienen los niveles normales de hemoglobina y el glutatión reducido producido se utiliza en la actividad de gliceraldehído - 3 - fosfato deshidrogenasa, enzima clave en el funcionamiento del esquema glicolítico, única vía productora de ATP en el eritrocito. (13,14).

El eritrocito tiene una vida total en el hombre de 120 a 125 días, (15,16); durante el curso del envejecimiento de la célula roja algunos procesos enzimáticos (DNasa y RNasa entre otros) desaparecen otros dependientes de enzimas de vida media (Glucosa - 6 - fosfato deshidrogenasa, 6 - fosfogluconico deshidrogenasa, etc.) disminuyen notablemente. Por último otros catalizados por enzimas muy estables (Deshidrogenasa láctica, metahemoglobina reductasa) no experimentan ninguna alteración en el curso de la vida celular. (17,18) Como efecto de la disminución en la actividad catalítica de las enzimas de vida corta e intermedia los niveles de glutatión y de adenosina trifosfato disminuyen (19,20) esto determina alteraciones osmóticas con disminución del tamaño del eritrocito, aumento en su densidad, disminución en el contenido lipido de la membrana celular, activación de algunas enzimas hidrolíticas y en consecuencia destrucción del glóbulo rojo. (21,22) El cuadro normal puede ser modificado por múltiples condiciones patológicas. (23,24) Se sabe en efecto, que la disminución en la actividad catalítica de glucosa - 6 - fosfato deshidrogenasa desencadena modificaciones muy importantes en la estructura de hemoglobina que llevan a la acumulación de proporción elevada de metahemoglobina (cerpos de Heinz), modificaciones en los niveles de glutatión reducido, de ATP y hemólisis subsiguiente (25,26).

Los eritrocitos con deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa pueden ser hemolizados rápidamente, cuando se ponen en contacto con acetilfenilhidrazina, substancia que produce disminución en los niveles de glutatión reducido; la prueba de estabilidad de glutatión reducido y de los eritrocitos después de la administra-

ción de acetilfenilhidrazina constituye una buena aproximación para enterarnos de los niveles de glutatión reducido (27,28,29).

Los niveles de metahemoglobina (Fig 2) en el eritrocito dependen por consiguiente de la actividad catalítica normal de varias enzimas: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfogluconico-deshidrogenasa deshidrogenasa láctica, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y evidentemente de la buena función de las metahemoglobina reductasas. Existen dos enzimas, (las metahemoglobina reductasas) con capacidad de transportar electrones hacia metahemoglobina (No. 1 y 2 de la Fig 2) y reducirla a hemoglobina, (30,31) una de ellas recibe los electrones de difosfopiridinolnucleótido reducido, la otra los acepta del TPNH; el acceptor final de electrones puede ser la metahemoglobina misma, el citocromo c, oxígeno o el azul de metileno; (Fig. 4) de cualquier modo ambas enzimas funcionan como trans electronasas y en este aspecto su actividad puede compararse al de la citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria. La estructura de estas metahemoglobina reductasas es muy peculiar (32) ya que además del grupo heme y de todas las hemoproteínas parece requerir la presencia de otro grupo prostético con nivel de óxido-reducción muy similar al del sistema de azul de metileno; este segundo cofactor es muy lábil se pierde con facilidad en el curso de la purificación enzimática, y es indispensable adicionar azul de metileno u otra sustancia con nivel de óxido-reducción similar para mediar la actividad enzimática cuando la proteína ha sido muy purificada. Se ha considerado que en circunstancias especiales los sistemas de glutatión oxidado y ácido ascórbico (33) pueden ser importantes en la conversión de metahemoglobina a hemoglobina. La deficiente transformación de la metahemoglobina a hemoglobina determina la aparición de las llamadas metahemoglobinemias, enfermedades generalmente de tipo congénito que se manifiestan de modo especial en caso de esfuerzo físico sostenido (34,35)

En el Departamento de Bioquímica del Hospital de Las Enfermedades de la Nutrición, se ha iniciado el estudio de diferentes enzimas y cofactores del eritrocito de rata en relación a diferentes condiciones nutricionales y se ha pensado en aplicar los conocimientos obtenidos a casos humanos con patología relacionada al glóbulo re-

jo. Como primer paso en este camino se pretende realizar el estudio cinético de las enzimas de importancia metabólica para esta célula.

El objeto de esta tesis es demostrar el comportamiento cinético de la metahemoglobina reductasa dependiente de TPNH como parte del estudio mencionado.

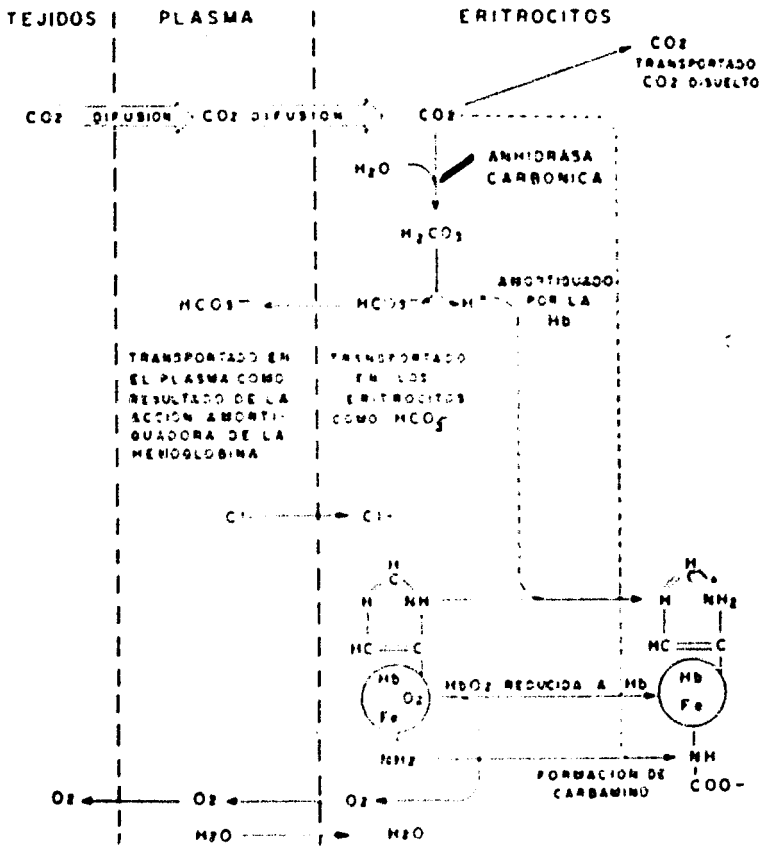


FIG. 1 PROCESOS QUE OCURREN EN EL PASO DEL CO₂ DE LOS TEJIDOS HACIA LA SANGRE LA HEMOGLOBINA DE MANERA ESQUEMATICA MUESTRA SOLO LOS ANILLOS MIDAZOLICOS DE LA HISTIDINA Y LOS GRUPOS TERMINALES NH₂ DE DIVERSOS AMINOACIDOS A NIVEL DE LOS PULMONES SUCEDE EL FENOMENO TOTALMENTE INVERSO (MODIFICADO DE DAVENPORT)

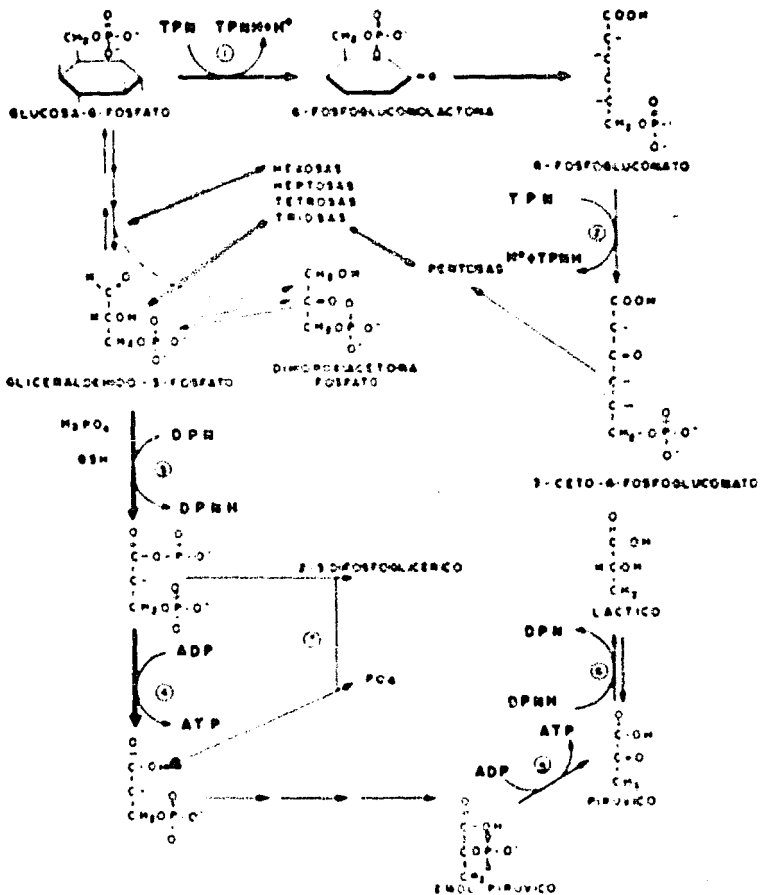


FIG 2- METABOLISMO DE GLUCOSA POR EL ERIROCITO

1. 6 SITIOS DONDE SE PRODUCEN DPNH, TPNH O ATP
2. REACCION QUE REQUIERE OH⁻
3. CICLO DE RAPPORT-LUEBERING

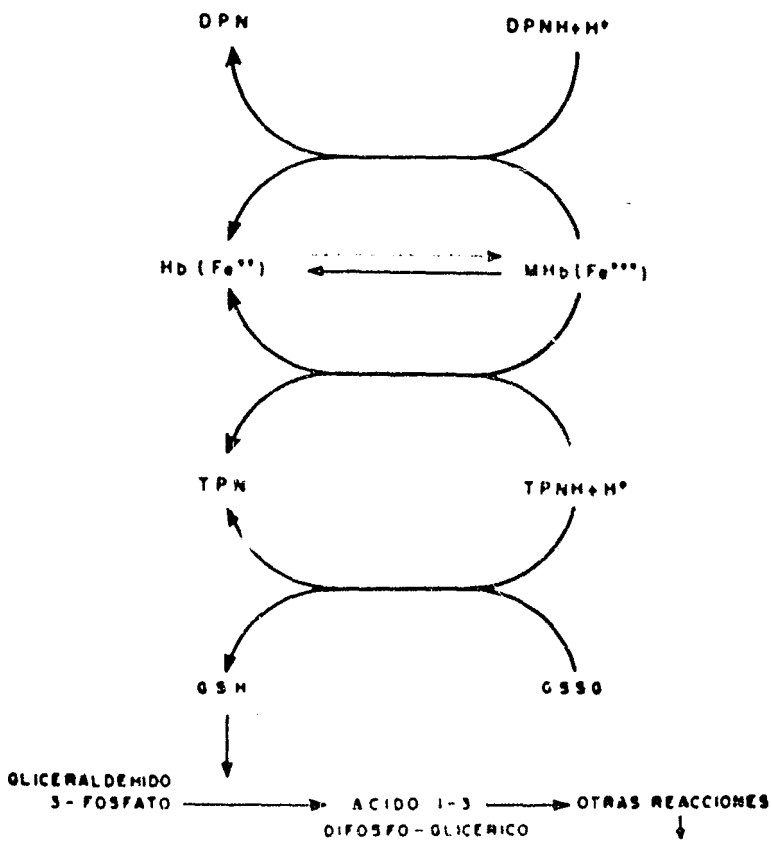


FIG - 3 UTILIZACION DE DPNH Y TPNH EN LA REDUCCION DE METAHEMOGLOBINA (MHb) A HEMOGLOBINA (Hb) Y DE TPNH PARA LA REDUCCION DE GLUTATION AXIDADO A GLUTATION REDUCIDO UTILIZACION DE GLUTATION REDUCIDO EN EL ESQUEMA GLICOLITICO

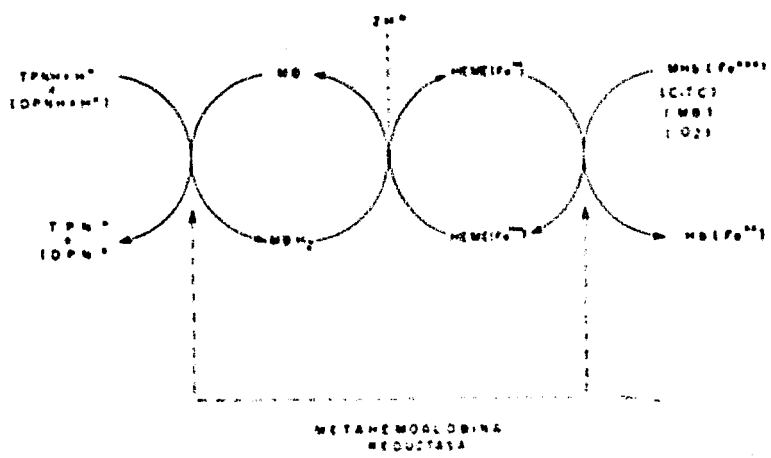


FIG. 4 - MECANISMO DE ACCION DE LA METHEMOGLOBINA REDUCTASA

MATERIAL Y METODOS

Ratas de la cepa Wistar de 250 gramos aproximadamente se anestesiaron con éter y se les extrajo sangre por punción cardíaca (4-5 ml); se evitó la coagulación con heparina.

La sangre se centrifugó a 2000 g durante 10 minutos y el plasma se extrajo mediante una pipeta pasteur y fue desechado.

El paquete eritrocítico fue lavado tres veces con igual volumen de cloruro de sodio isotónico, la cuenta globular final fue de 20,000 glóbulos rojos por 1 blanco. Los glóbulos rojos lavados fueron lisados por la adición de agua destilada y el hemolizado se usó como fuente enzima. Todos los pasos se efectuaron a 4 C.

Método

El ensayo de la enzima se basa en la disminución en absorbancia a 340 m μ por oxidación del TPNH.

EL SISTEMA CONTIENE:

Solución amortiguadora de fosfato potasio; pH 7.0	0.1M	1	ml.
Enzima dilución 1:5		0.2	ml.
Azul de metileno 0.027M		0.1	ml.
TPNH 0.0015M		0.2	ml.

Llevar a 3 ml con la solución amortiguadora.

En el blanco se omite el TPNH

La reacción se inicia con TPNH; las lecturas se efectúan con intervalos de medio minuto durante 10 minutos aproximadamente.

la velocidad de reacción se corrige por la lenta oxidación química del TPNH.

Preparación de los reactivos

Solución amortiguadora de fosfato.

Disolver 1,68 gs de fosfato dibásico de potasio, agua destilada c.b.p. 100 ml.

Disolver 1,2 gs de fosfato dipotásico en agua destilada c.b.p. 100 ml.

Poner 38,9 ml de la solución de fosfato dibásico de potasio y ajustar el pH a 7 con la solución de fosfato dipotásico y luego ajustar a 100 ml. con agua destilada

Azul de metileno 0,027M

Disolver 0,117g de azul de metileno, llevar hasta 100 ml. con agua destilada

TPNH 0,0015 M

Disolver 0,1007 g. de TPNH (Sigma) en agua destilada c.b.p. 10 ml.

Definición de Unidad

Es la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de una micromola de TPNH en un minuto.

Para determinar las unidades en cada sistema nos basamos en el coeficiente de extinción del TPNH

la velocidad de reacción se corrige por la lenta oxidación química del TPNH.

Preparación de los reactivos

Solución amortiguadora de fosfato.

Disolver 1,68 gs de fosfato dibásico de potasio, agua destilada c.b.p. 100 ml.

Disolver 1.2 gs de fosfato dipotásico en agua destilada c.b.p. 100 ml.

Poner 38.9 ml de la solución de fosfato dibásico de potasio y ajustar el pH a 7 con la solución de fosfato dipotásico y luego ajustar a 100 ml. con agua destilada.

Azul de metileno. 0.027M.

Disolver 0.117g. de azul de metileno, llevar hasta 100 ml. con agua destilada

TPNH 0.0015 M.

Disolver 0.1007 g. de TPNH (Sigma) en agua destilada c.b.p. 10 ml.

Definición de Unidad

Es la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de una micromola de TPNH en un minuto.

Para determinar las unidades en cada sistema nos basamos en el coeficiente de extinción del TPNH.

RESULTADOS

ESPECTRO DE ABSORCION DEL AZUL DE METILENO. (FIG. 5).

El objeto de este espectro es saber si al trabajar a 340 μm , no interfiere el azul de metileno cuando tratamos de observar el sistema que estudiamos, pero como se puede ver en la gráfica a dicha longitud de onda la actividad del azul de metileno es muy baja y no afecta en nada.

Existen dos máximos; uno a 300 y el otro a 665 μm . La absorción a 340 μm no es significativa.

CURVA DE PROGRESO. (FIG. 6).

La velocidad inicial se mantiene 35 minutos durante los cuales 0.45 micromolas de TPNH se transformaron a TPN.

CURVA DE SUBSTRATO. (FIG. 7, 8, 9).

En esta curva se varió la concentración del substrato ya que se fue poniendo en el sistema desde 0.2 micromola hasta 1.50, se observó que la velocidad máxima se obtuvo con concentraciones superior a 0.50 micromolas, esto es equivalente a la oxidación de aproximadamente 0.164 micromolas de TPNH.

La constante de Michaelis calculada por diferentes métodos varía entre 0 a 1.5×10^{-4} .

CURVA DE ENZIMA. (FIG 10).

En esta curva lo que se varió en el sistema fué la concentración de la enzima y se observó que la actividad es directamente proporcional a dicha concentración, cuando la cantidad del hemolizado es inferior a 50 microlitros

Las concentraciones van desde 20 microlitros hasta 200.

CURVA DE pH (FIG 11)

Se demuestra la existencia de dos pH óptimos uno a 7.5 aproximadamente, el otro tal vez se encuentra por debajo de 2.5. No hubo ninguna modificación al variar la fuerza iónica ni fenómenos de activación o de inhibición por introducción de diferentes sustancias como amortiguadoras

CURVA DE TEMPERATURA (FIG 12).

La energía de activación calculada a partir de la ecuación de Arrhenius (inversa de la temperatura absoluta) es aproximadamente de 10.000 calorías por mola

ESPECTRO DE ABSORCIÓN EN SOLUCIÓN DE METILÉNO

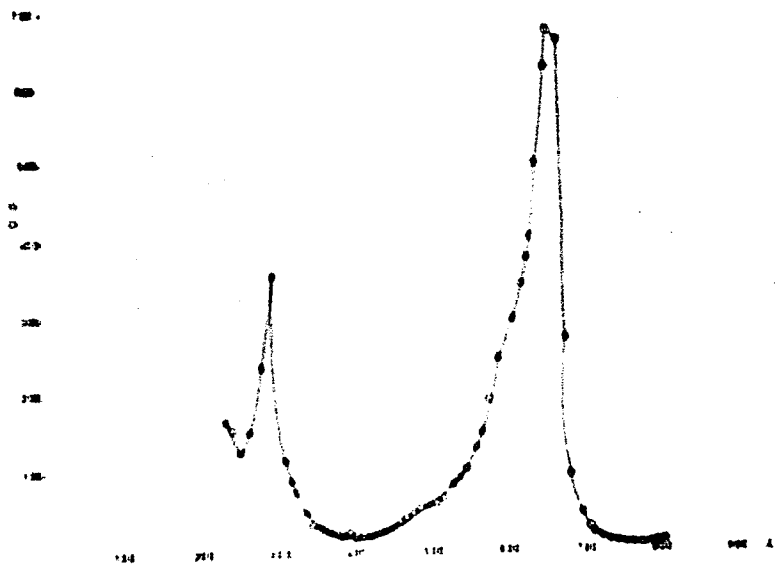


Figura No. 5

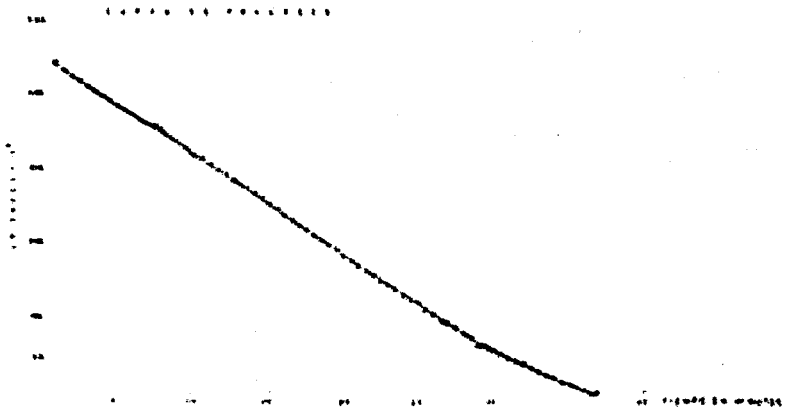


Figura No. 6

ACTIVATION OF POLYMER TO A CONCENTRATED SOL SUBSTRATE

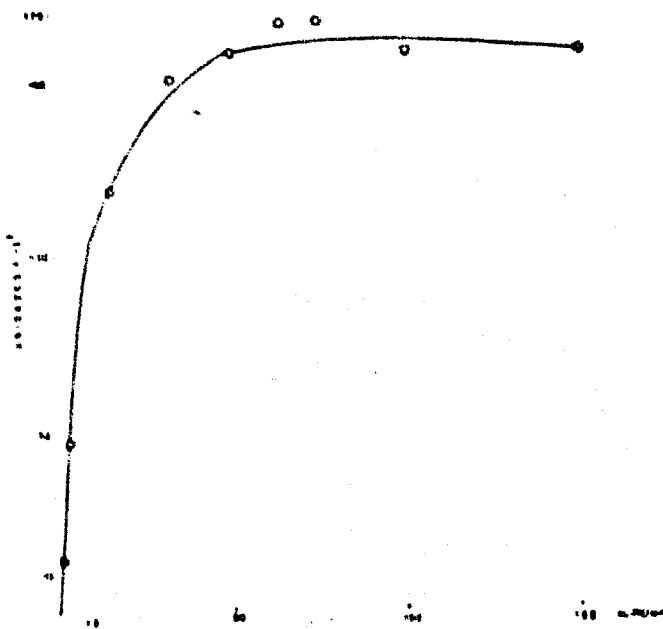


Figura No. 7

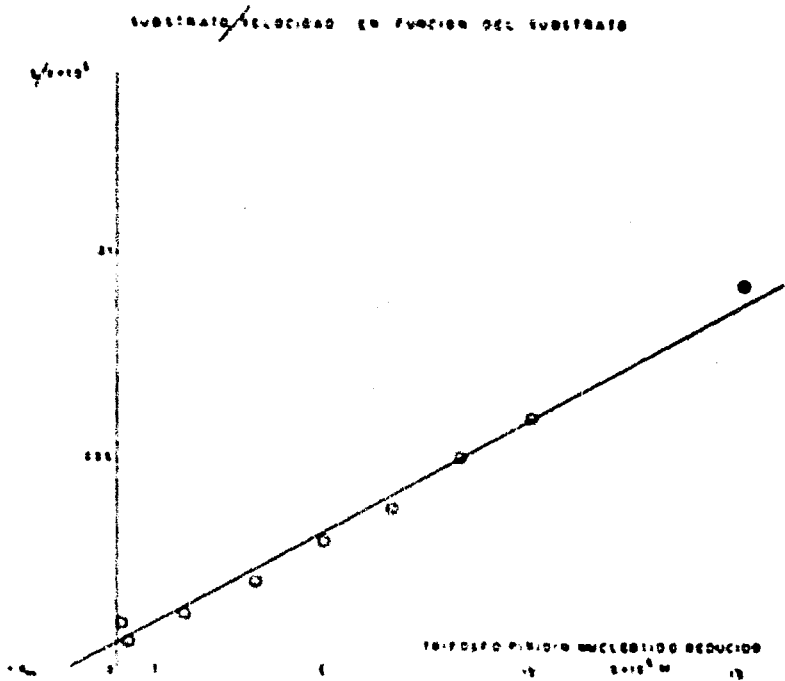


Figura No. 8

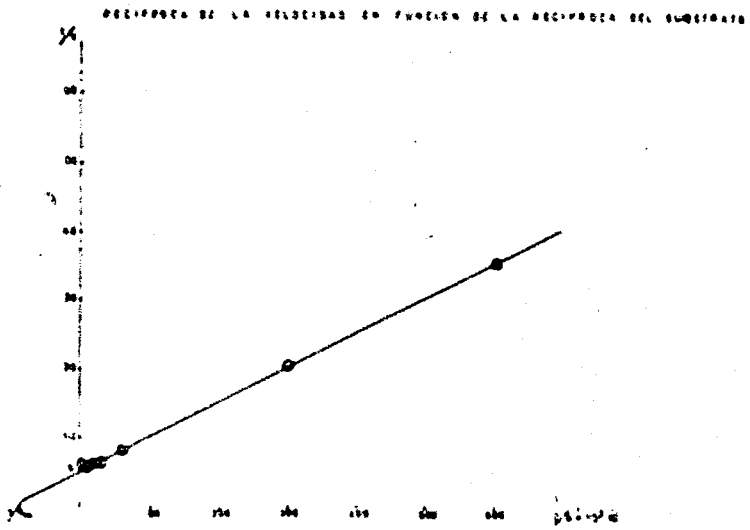


Figura No. 9

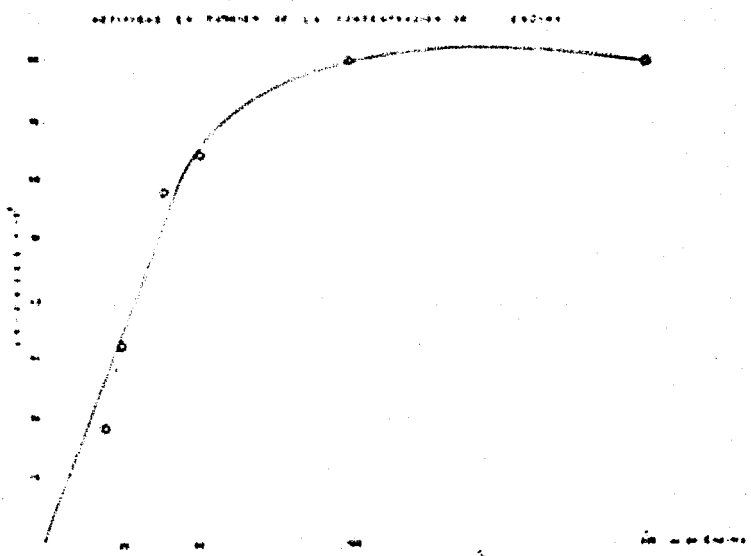


Figura No. 10

afinidad en función del pH

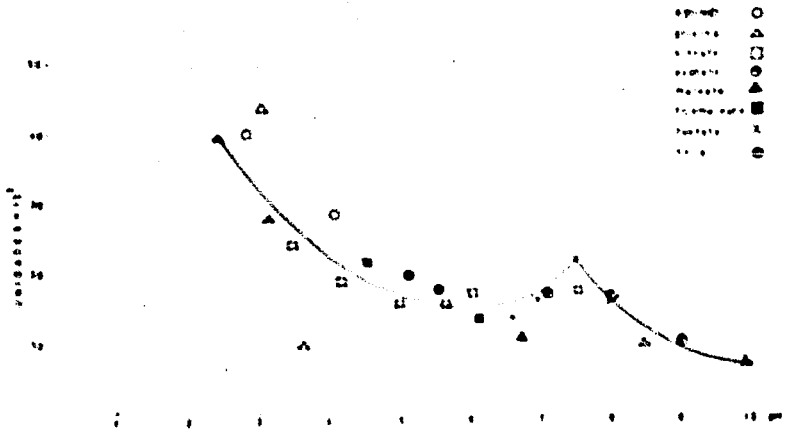


Figura No. 11

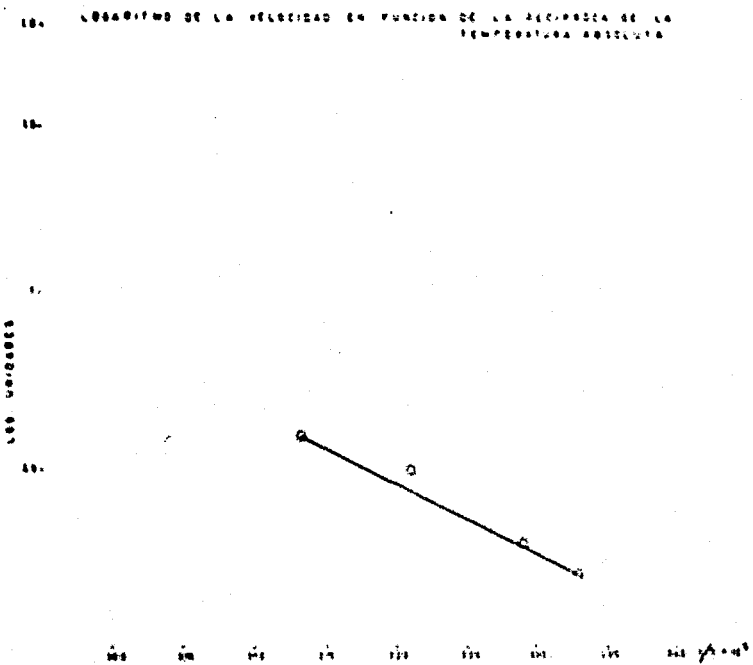


Figura No. 12

DISCUSION

Los resultados obtenidos permiten afirmar que el método descrito ofrecen ventajas muy importantes como son las de tratarse de un método sensible, reproducible, económico y de fácil manejo.

El coeficiente de extinción molar del TPNH y del azul de metileno son suficientemente altos para asegurar la medición de cambios relativamente pequeños en la actividad enzimática. El hecho de que se pueda medir la desaparición del azul de metileno en la zona visible del espectro permite utilizar este método en laboratorios con el equipo habitual.

La curva de progreso nos indica el mantenimiento de las condiciones iniciales del sistema aún cuando el período de actividad enzimática se prolongue por 35 minutos. Esto claramente contrasta con el tiempo de 10 minutos que fue el habitualmente usado por nosotros. Durante ese período de 35 minutos se puede en consecuencia, afirmar que la cantidad de sustrato es la adecuada para mantener la enzima saturada; se puede así mismo, afirmar que no se produjo ninguna alteración en la estructura enzimática, en el pH y que no hubo aparición de activadores e inhibidores en el sistema.

La curva de sustrato y las curvas recíprocas nos indican, sin embargo que la cantidad indispensable para obtener velocidad máxima es de 0.50 micromolas de TPNH, esto sin embargo no es de importancia definitiva pues la afinidad de la enzima por su coenzima es relativamente grande ya que la constante de Michaelis es muy pequeña.

La curva de enzima demuestra que el método es adecuado cuando se trabaja con 50 microlitros o menos de hemolizado, cuando el hematocrito era de 50% aproximadamente

La curva de pH presenta dos máximos: uno a pH de 7.5 y el otro a pH de 2 aproximadamente. El incremento en la actividad enzimática a pH por debajo de 5 es muy probablemente consecuencia del aumento en la concentración de iones hidrógenos en el medio; en efecto, el trifosfopiridinonucleótido reducido para ceder sus dos electrones al grupo prostético de la metahemoglobina reductasa, requiere la introducción de un protón del medio ambiente; en consecuencia, la disminución del pH podrá forzar la reacción en el sentido de un aumento aparente en la actividad enzimática. La modificación de la fuerza iónica introducida al cambiar la sustancia amortiguadora no tuvo ningún efecto sobre actividad enzimática.

La energía de actividad necesaria para la iniciación de la reacción enzimática fué de 10,000 calorías

Aparentemente toda la actividad enzimática se encontró en el hemolizado. No hubo actividad cuando se trabajó en el estroma, y la adición de este al hemolizado no tuvo ningún efecto sobre la velocidad de ésta. No hubo catálisis cuando se usaron glóbulos rojos no hemolizados

RESUMEN Y CONCLUSIONES

- 1.—Se revisaron las publicaciones pertinentes.
- 2.—El método descrito es de gran sensibilidad, muy reproducible, de fácil manejo y muy económico.
- 3.—La constante de Michaelis de la enzima por su coenzima es de muy pequeña magnitud, esto permitió a la vez que trabajar a bajas concentraciones de TPNH, investigar los efectos enzimáticos dentro de rangos amplios de "concentración" de enzima.
- 4.—La curva de pH obtenida fue muy peculiar y su posible significado se discute.
- 5.—La enzima fue insensible a cambios muy amplios en la fuerza iónica.
- 6.—La enzima se localiza exclusivamente en el sobrenadante y se demostró que en el estroma no había ningún factor activador o inhibidor de la reacción.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—Biochemistry of blood in health and disease. Kugelmass, N. Charles C. Thomas Publisher Springfield Illinois U.S.A. (1955) Chapter XI pag. 255.
- 2.—Huennekens F. M., Cafrey R. W., Basford R. E. and Gabrio B. W. J. Biol. Chem. 227: 246 (1957).
- 3.—Gutman H., Jandorf M. and Bodansky O. J. Biol. Chem. 169: 145 (1947).
- 4.—Dine M. S., A.M.A. J. Dis. Child. 92:15 (1956)
- 5.—Huennekens F. M., Cafrey R. W. and Gabrio B. W. Ann. N. Y. Acad. Sci. 75:167 (1958)
- 6.—Borhetti A., Feaccadori F., La Greca G., Pecchini F. J. Clin. Med. 42:15 (1961).
- 7.—Murphy J. R. J. Lab. and Clin. Med. 55:286 (1960).
- 8.—Hansjürges Mathies. Izvest. Inst. Eksptl. Vet. Med. Bulgar. Akad. Nauk 2:339 (1957).
- 9.—Alivisatos, S.G.A., Kashket, S. and Denstedt, O.F. Canad. J. Biochem. and Physiol. 34:46 (1956).
- 10.—Hofman, E.C.G., Karadshowa M., and Klecker J. Folia Hematol. 76:432 (1956)
- 11.—Rigas D. A. and Keller R. D. J. Lab. Clin. Med. 58:417 (1961)

- 12.—Rall, T.W. and Lehninger, A. L. *J. Biol. Chem.* 194:119 (1952).
- 13.—Scott E.N. and Hoskins D.D. *Blood* 13:795 (1958).
- 14.—White, A., Handler P., Smith E. L., Stetten DeWitt. *Principles of Biochemistry* pag. 667 (1959). Mc Graw-Hill Book Company, Inc. New York (1959).
- 15.—Di Toro R., Cutillo S., Iafusco F., Spina D. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 36:968 (1960).
- 16.—Marks, P. A., Johnson, A. D. and Hirschberg E. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 44:529 (1958).
- 17.—Allison, A. C., and Brom, G. P. *Brit J. Haematol.* 1:291 (1955).
- 18.—Kiese, M., Schneider, C. and Waller, H. D. *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol* 231:158 (1957).
- 19.—Scott E.M. and Hoskins D.D. *Blood* 13:785 (1958).
- 20.—Yaniasoc, N. S. and Yoshikawa H. J. *Biochem.* 49:487 (1961).
- 21.—Bartlett, G. R. and Marlow, A. A. *Bull. Scrips. Metabol Clin.* 2 (1961).
- 22.—Huennekens, F. M. Liu, L., Myers, H.A.P. and Gabrio B.W. *J. Biol. Chem.* 227:253 (1957).
- 23.—Marks, P. A., Szenberg A., Banks J. J. *Biol. Chem.* 236:10 (1961).
- 24.—Gross, R.T., Hurwitz, E.E. and Marks, P.A. *J. Clin. Invest.* 37:1176 (1958).
- 25.—Harley, J. D., Manuer A.M. *Blood* 17:418 (1961).
- 26.—Roza, G. and Spicer S.S. *Nature* 171:84 (1953).
- 27.—Beaven, G.H. and White, J. C. *Nature* 173:389 (1954).
- 28.—Tjoa G. T. Z. *Kiderherk* 84:484 (1960).
- 29.—Dumant, E., Landberg E., and London I.M. *J. Biol. Chem.* 213:769 (1955).

- 30.—Beike, K., Baltz, A., Kleihauer, E. and Scholz P. *Blut.* 6:203 (1960) (*Chem. Abs.* 55:466 (1961)).
- 31.—Gibson H. Q. *Biochem. J.* 42:13 (1948).
- 32.—Guloff N., Wheaton R. J. *Pediat.* 58:86 (1961).
- 33.—Barerof, H., Gibson Q. H., Harrison D.C. and Mc. Murray J. *Clin. Sci.* 5: 145 (1945).
- 34.—Gibson Q.H. and Harrison D. C. *Lancet* 253:941 (1947).
- 35.—Eder Q. H., Finch and Mc. Kee R. W. *J. Clin. Inv.* 28. 261 (1949).